RRHT (1.8µm) Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムを用いたタキサンの高分離分析

アプリケーション

製薬

著者

William J. Long、John W. Henderson Jr.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

Agilent ZORBAX RRHT (Rapid Resolution High Throuhput) Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムを使用して、13 個のタキサン誘導体を分離しました。グラジェント分離条件を変更することにより、すべてのピークについて高分離 (Rs = 2) を維持しました。G1315SL ダイオードアレイ検出器の後に Agilent G1956B シングル四重極質量分析計で測定しましたが、クロマトグラフィ分解能の大きな損失は認められませんでした。改善されたシリカ、エンドキャップ処理、結合テクノロジなどの特性に加え、タキサン誘導体中の共役によるフェニルヘキシル部分の分子間相互作用により、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムはこの RRHT タキサンメソッドに対して理想的な選択肢であることが示されました。

はじめに

タキサンは、パクリタキセルとドセタキセルを含むジテルペンであり、ガンの治療に使用されています。タキサンクラスの薬物の主要メカニズムは、微小管機能の破壊です。微小管は細胞分裂に不可欠な細胞組織であり、タキサンはその分裂ステップを阻止します。正常な細胞の成長においては、微小管は細胞が分裂を開始するときに形成されます。細胞分裂後に、微小管は破壊されます。タキサンは、微小管の分解を阻止します。がん細胞の働きは微小管によって妨げられ、成長および分裂できなくなります。 [1,2]

元来、パクリタキセルは太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) から抽出されていましたが、10g のパクリタキセルを分離するには、1,200kg を超える樹皮が必要でした。太平洋イチイの不足により、他の樹木、つまりヒマラヤイチイから半合成タキサンが抽出されるようになりました。今日流通しているタキサンのほとんどは細胞培養法を使用して生産されています。 [2,3]

さまざまなタキサン誘導体には、それぞれ異なる薬効特性があります。治療効果の改善を目指し、製薬会社はより新しいタキサンの変種の調査と開発を継続しています。今回の実験では、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムを用いてパクリタキセルと 12 種類以上の変種の分離に成功しました。

実験手法

Agilent 1200 RRLC (Rapid Resolution LC) システムでタキサンの分析を行いました。

- 移動相 A に水中の 0.1% ギ酸、B にアセトニトリル中の 0.1% ギ酸を含む G1312B バイナリポンプ SL。流量は 1mL/min です。グラジェントは 30% B の初期組成であり、15 分間で 45% B に上昇してから、さらに 5 分間で 60% B に上昇しました。

- G1376C オートサンプラ SL (ALS)。注入量：5.0µL。
- G1316B 温度制御カラムコンパートメント (TCC) SL。温度：25℃。
- G1316C ダイオードアレイ検出器 (DAD) (使用波長は 254,4 nm Ref = off) と、G1315-60024 マイクロフローセル (3-mm パス、2µL 容量)
- DAD マイクロフローセル出口から質量分析計注入口に直列で接続された G1956 MSD/SL シングル四重極質量分析計。

ZORBAX カラム:

- Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 4.6 x 50 mm、1.8µm、部品番号 959941-912
- Eclipse Plus C18 4.6 x 50 mm、1.8µm、部品番号 959941-902

試薬

HPLC グレードのアセトニトリルは、Burdick & Jackson (Muskegon、MI) から入手しました。18 MW Milli-Q 水はオンサイトで生成しました。ギ酸は Sigma Aldrich (Bellfonte、PA) から入手しました。それぞれ約 50µg/mL のタキサンアルカロイドを含む "13-mix" タキサン混合物質は、IB Hauser Chemical (Boulder、CO) から購入しました。溶出順序は表 1 のとおりです。パクリタキセルとセファロマンニンの標準試料は、Sigma Aldrich から購入しました。これら 2 つの化合物は、質量分析に加えてピークの確認で使用するために、1mg/mL のアセトニトリルで溶解し、次に水で希釈して、最終的にそれぞれ 100µg/mL に調製しました。

結果と考察

パクリタキセルの構造を図 1A に示します。この混合物質に見られるその他の関連化合物は、この構造では微細な変種です。この系列における微細な置換の例は、図 1B のセファロマンニンであり、その相違を枠内で示しました。

構造が類似する化合物を分析するには、アイソクラティックメソッドよりもグラジェントメソッドの方が適しています。大量の共役と複数の芳香環の構造から、C18 カラムに加えてフェニルカラムの使用が適している可能性が示されます。多くの創薬研究所ではさらなる情報の取得のために質量分析法を使用しているため、揮発性の酸性移動相添加剤 (ギ酸) を選択しました。これにより、カラムの寿命が延び、残留シラノールの影響が低減され、MS の化合物のイオン化が良好になります。短い RRHT (Rapid Resolution High-Throughput) カラムは、効率が高く、分析が高速で、平衡化時間が短いだけでなく、圧力が低いため、典型的な 400 bar の HPLC システムでもこのカラムを選択しました。[4]

表 1. Eclipse Plus Phenyl-Hexyl を用いた分離

ピーク	化合物	分子量	tr	Rs	k'
1	10-デアセチルバッカチン III	544	1.79	NA	2.6
	不純物質	判別不可	2.75	8.42	4.5
2	バッカチン III	586	3.81	6.98	6.6
3	7-キシロシル-10-デアセチルタキソール B	921	5.86	11.73	10.8
4	タキシニン M	703	6.34	2.37	11.7
5	7-キシロシル-10-デアセチルタキソール	943	7.1	3.59	13.2
6	7-キシロシル-10-デアセチルタキソール C	937	7.93	4.02	14.9
7	10-デアセチルタキソール	811	9.01	4.7	17.1
8	7-キシロシルタキソール	985	9.55	2.27	18.1
9	セファロマンニン (タキソール B)	831	11.53	7.85	22.1
10	7-エピ-10-デアセチルタキソール	811	12.22	2.42	23.5
11	パクリタキセル	853	13.12	3.11	25.3
12	タキソール C	847	14.24	3.81	27.6
13	7-エピタキソール	853	16.82	9.21	32.7

Theodoris らの実験では、複数の C18 およびフェニルカラムを使用して、同じ Hauser 13 タキサン混合物質を評価しました。分離には 30～70 分が必要で、平衡化のためにさらに 5～10 分が必要でした (3～5 のカラムボリューム)。これらのほとんどのケースでは、分離は非常に良好でしたが、すべての化合物が完全に分離されたわけではなく、MS に分離が保持されました。[5]

パクリタキセル

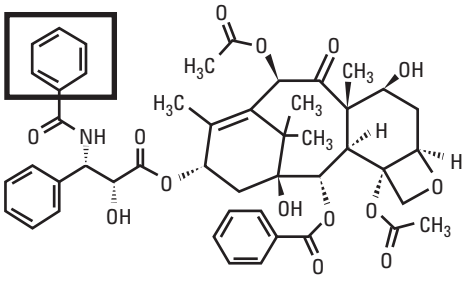

図 1A.

セファロマンニン

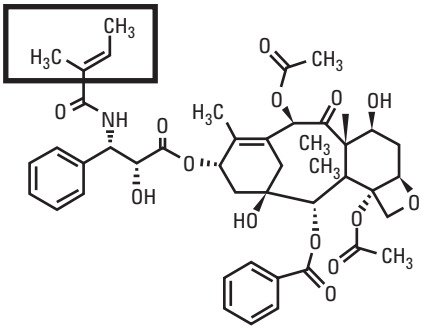

図 1B.

今回の分析では、最終的な分離はより高速化され、結果の分解能は改善されました。図 2 に、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムおよび Eclipse Plus C18 カラムで分離されたタキサンのピークの重ね書きを示します。カラムは異なりますが、それ以外のメソッドは同一です。Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムは、タキサンに関して Eclipse Plus C18 よりも良好な感度を示しました。ピーク 6 と 7 は、C18 カラムでは完全には分離されていないことに注意してください。Rs値が良好であることは、フェニルヘキシル基を含む分析対象物の π-π 相互作用によるものと考えられます。

図 3 に、フェニルヘキシルカラムを用いた場合の UV および MS 両方のトータルイオンクロマトグラムを示します。近接した 2 つのピークは 10-デアセチルタキソールと 7-キシロシルタキソール (ピーク 7 と 8) で、どちらも明確にベースライン分離されています。これらのピークは、MS に送られた後もベースライン分離されています。実験中には、識別されない別のピークが出現し、このグラジェントで分離されました。これは Hauser の元のサンプル混合物質にも見られましたが、濃度ははるかに低いものでした。

MS を使用して、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムでの分析対象物の溶出順序を検証しました。表 1 に、対象化合物の分子量を示します。一覧にあるすべての化合物について、m/z 値が M+1 である擬似分子イオンが見られました。図 3 に示すように、DAD と MS 検出器の間で分解能の大幅な損失は見られませんでした。この分析には、パルスダンパを使用しました。最大圧力は約 240 bar で、これはより高い流速が可能であることを示しています。分析時間は流量に比例して短縮できましたが、次の式を使用して k' を維持しました。

グラジエント時間の調整

$$t_{G2} = t_{G1} \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{F_1}{F_2}$$

t　グラジェント時間
V　カラムボイドボリューム
F　流量

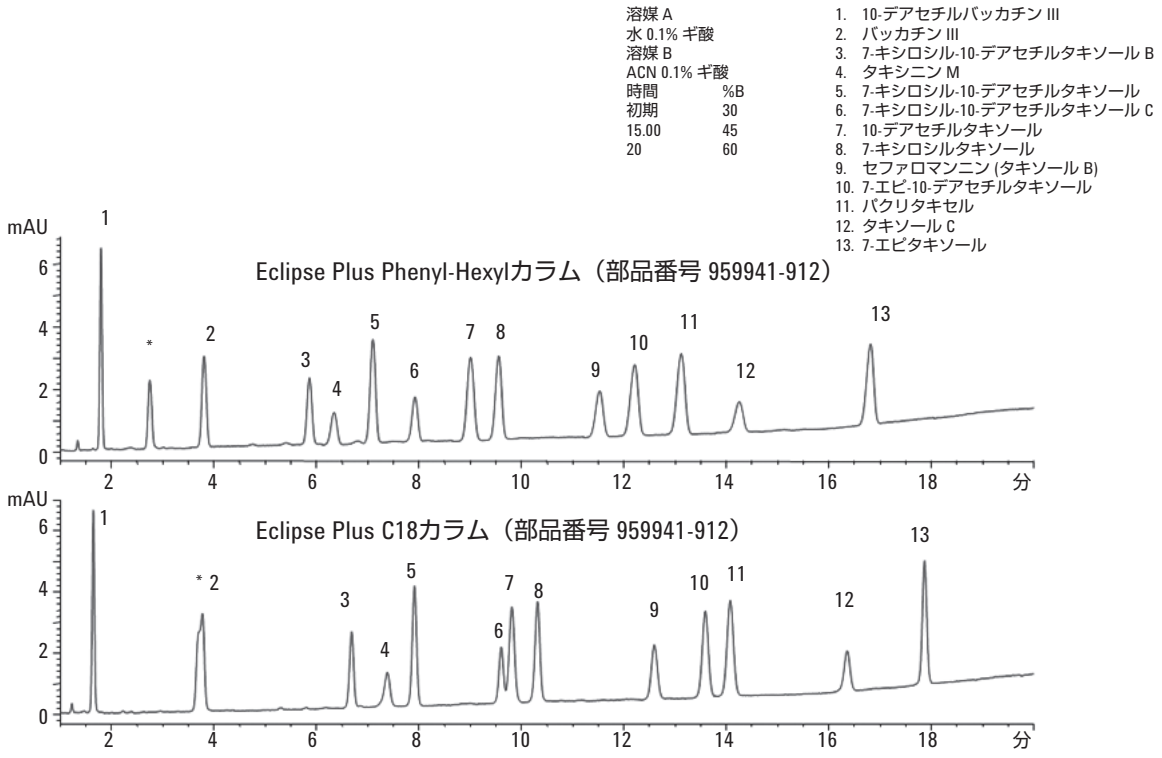

図 2.　Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl および C18 カラムでのタキサン混合物質の分離

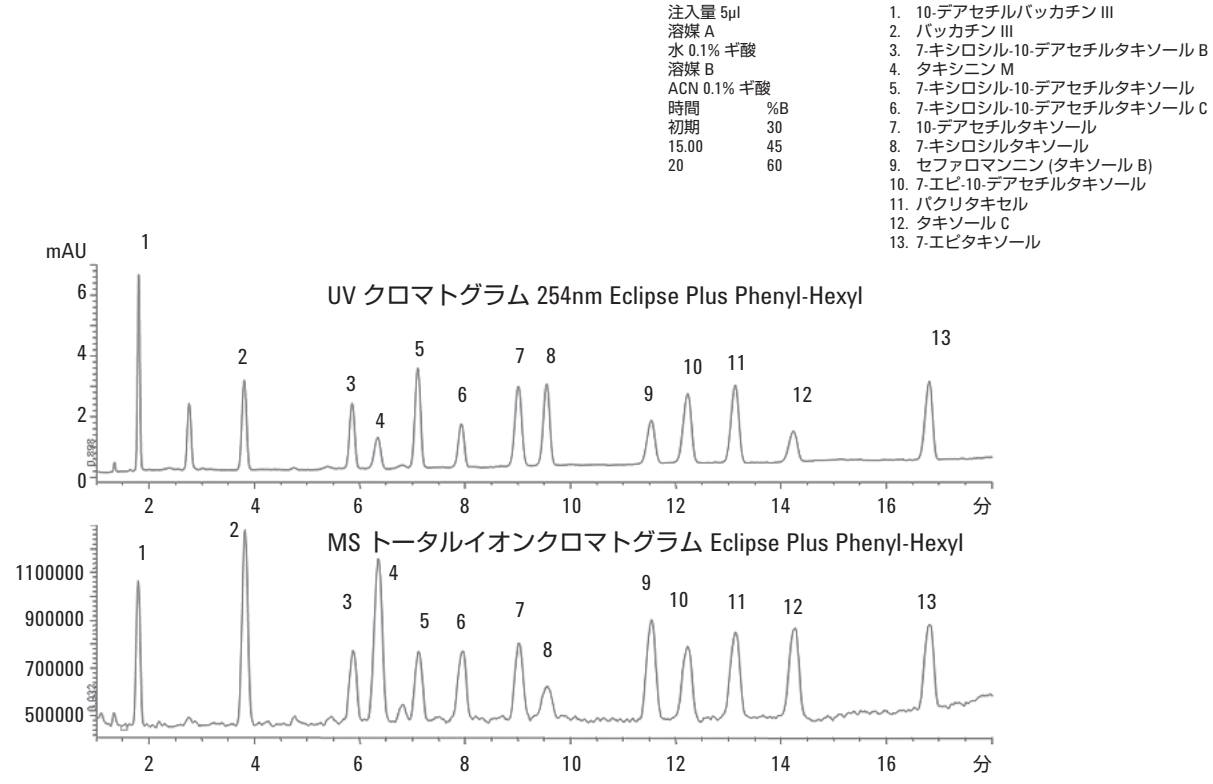

図 3.　Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムでのタキサン混合物質の UV および MS クロマトグラムの重ね書き

結論

RRHT Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムを用いて、13 のタキサン化合物の混合物質を良好に分離しました。ここで示したメソッドは、π-π 相互作用およびフェニル相互作用に基づいて良好に分離可能であるため、Phenyl-Hexyl カラムは、C18 カラムよりも優れた結果を示しました。カラムを変更するだけで改善が可能であり、複雑な移動相組成を必要としません。Eclipse Phenyl-Hexyl カラムでの分離は、圧力が 400 bar を大幅に下回っているため、ほとんどのHPLC システムで実行できます。

進行ガンの患者の多くが治療中にタキサンを投与されているという事実からも、タキサンが進行ガンの化学療法で重要な位置を占めていることがわかります。パクリタキセルとドセタキセルがこの市場をリードしていますが、既存のタキサンよりも高い効率を示す新しいタキサンの開発が医療関係者から期待されています。

改善されたシリカ、エンドキャップ処理、結合技術などの特性に加えて、タキサン誘導体中の共役によるフェニルヘキシル部分の分子間相互作用により、Eclipse Plus Phenyl-Hexyl カラムはタキサン分析における優れた選択肢ということができます。

参考文献

1. Dictionary of Cancer Terms “Taxane” http://www.cancer.gov
2. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail, “Plant Antitumor Agents. VI. Isolation and Structure of Taxol, A Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia,*” *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 2325–2327
3. Bristol-Myers Squibb Company Development of a Green Synthesis for Taxol Manufacture via Plant Cell Fermentation and Extraction, 2004 Greener Synthetic Pathways Award http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/pgcc/winners/gspa04.html
4. W. Long and J. Henderson, “Unique Selectivity and High-Throughput Applications of SB-Phenyl RRHT,” Agilent Technologies publication 5989-6067EN, 2007
5. G. Theodoridis, G. Laskaris, C. F. de Jong, A. J. P. Hofte, and R. Verpoorte, “Determination of Paclitaxel and Related Diterpenoids in Plant Extracts by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection in High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry,” *Journal of Chromatography A,* Volume 802, Issue 2, 10 April 1998, Pages 297–305.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
August 28, 2008
5989-9340JAJP

Agilent Technologies